

7/ 554386 INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/EP 98/07057

RECEIVED

OCT 25 2000

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K31/575 A61K31/70 A61K31/715

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

TECH CENTER 1600/2900

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K A23L A23D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 98 23277 A (HENKEL KGAA) 4 June 1998 see page 2, paragraph 5 - page 3, paragraph 1; claims 1-10 see page 5, paragraph 3-4	1, 2, 5-10
A	DE 24 08 067 A (PROCTER & GAMBLE) 5 September 1974 see page 1 - page 2, paragraph 1 see page 3, paragraph 2; claims 1-4 see page 5, paragraph 4 see page 7, paragraph 2 - page 8	1-4, 6, 9, 10
A	US 5 244 887 A (STRAUB CARL D) 14 September 1993 see column 6, line 10-12; claims 1-5 see column 6, line 23-41	1, 6
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 April 1999

Date of mailing of the international search report

04/05/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kanbier, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 98/07057

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 096, no. 004, 30 April 1996 & JP 07 330611 A (YAKULT HONSHA CO LTD), 19 December 1995 see abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,2
A	<p>WO 92 19640 A (RAISION MARGARIINI OY) 12 November 1992 see page 5, paragraph 2; examples 1-4 see page 6, line 30-34 see page 9, paragraph 3; claims 1,2,4,6,7</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,2
A	<p>FR 2 228 493 A (FERRER LABOR) 6 December 1974 see page 1, line 21-25; claims 1,2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Patent Application No

PCT/EP 98/07057

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9823277 A	04-06-1998	DE 19700796 A AU 5322998 A AU 5553198 A WO 9823275 A	04-06-1998 22-06-1998 22-06-1998 04-06-1998
DE 2408067 A	05-09-1974	US 3865939 A BE 811452 A CA 1024814 A FR 2218838 A GB 1413102 A JP 1135221 C JP 50040605 A JP 57026732 B NL 7402426 A,C	11-02-1975 22-08-1974 24-01-1978 20-09-1974 05-11-1975 14-02-1983 14-04-1975 07-06-1982 27-08-1974
US 5244887 A	14-09-1993	NONE	
WO 9219640 A	12-11-1992	CA 2102112 A AU 664827 B DE 69127207 D DE 69127207 T DK 594612 T EP 0594612 A FI 934869 A,B, FI 964951 A HK 1001951 A JP 6506909 T NO 933966 A PL 166991 B RU 2095367 C US 5502045 A	04-11-1992 07-12-1992 11-09-1997 22-01-1998 01-09-1997 04-05-1994 03-11-1993 11-12-1996 24-07-1998 04-08-1994 02-11-1993 31-07-1995 10-11-1997 26-03-1996
FR 2228493 A	06-12-1974	AT 336203 B AU 6874774 A BE 814741 A CH 589673 A DE 2422317 A GB 1473574 A JP 50129543 A JP 53035071 B NL 7406089 A,B ZA 7402921 A	25-04-1977 13-11-1975 02-09-1974 15-07-1977 21-11-1974 18-05-1977 13-10-1975 25-09-1978 12-11-1974 28-05-1975

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 31/575, 31/70, 31/715	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/25361 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. Mai 1999 (27.05.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/07057 (22) Internationales Anmeldedatum: 5. November 1998 (05.11.98) (30) Prioritätsdaten: 197 50 422.1 14. November 1997 (14.11.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF AKTIEN [DE/DE]; Henkelstrasse 67, D-40589 Düsseldorf (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FABRY, Bernd [DE/DE]; Danziger Strasse 31, D-41352 Korschenbroich (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, HU, ID, IS, JP, KR, LT, LV, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, TR, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i>
(54) Title: USE OF SELECTED PHYTOSTENOL ESTERS FOR PRODUCING HYPOCHOLESTERAEMIC PREPARATIONS (54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON AUSGEWÄHLTEN PHYTOSTENOLESTERN ZUR HERSTELLUNG VON HYPOCHOLESTERINÄMISCHEN MITTELN (57) Abstract <p>According to the invention, phytostenol esters with a conjugated fatty acid base are used for producing hypocholesteremic preparations which are significantly more active than the comparable prior art. When encapsulated in gelatine, the preparations can also be administered orally in higher doses without any problems.</p> (57) Zusammenfassung <p>Zur Herstellung von hypocholesterinämischen Mitteln wird die Verwendung von Phytostenolestern auf Basis konjugierter Fettsäuren vorgeschlagen, die gegenüber den vergleichbaren Produkten des Stands der Technik eine deutlich höhere Aktivität aufweisen. Durch Verkapselung in Gelatine lassen sich die Mittel problemlos auch oral in höheren Dosen verabreichen.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verwendung von ausgewählten Phytostenolestern zur Herstellung von hypocholesterinämischen Mitteln

Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Phytostenolestern, gegebenenfalls zusammen mit ausgewählten Potenzierungsmitteln zur Herstellung von Mitteln zur Verminderung des Cholesteringehaltes im Serum von Warmblütern.

Stand der Technik

Unter hypocholesterinämischen Wirkstoffen werden Mittel verstanden, die zu einer Verminderung des Cholesteringehaltes im Serum von Warmblütern führen, ohne daß dadurch eine Hemmung oder Verringerung der Bildung von Cholesterin im Blut eintritt. Für diesen Zweck wurden bereits von Peterson et al. in **J.Nutrit. 50, 191 (1953)** Phytostenole, also pflanzliche Stenole, und deren Ester mit Fettsäuren vorgeschlagen. In die gleiche Richtung weisen auch die Patentschriften **US 3,089,939**, **US 3,203,862** sowie die deutsche Offenlegungsschrift **DE-OS 2035069** (Procter & Gamble). Die Wirkstoffe werden üblicherweise Brat- oder Speiseölen zugesetzt und dann über die Nahrung aufgenommen, wobei die Einsatzmengen jedoch in der Regel gering sind und üblicherweise unter 0,5 Gew.-% liegen, um zu verhindern, daß die Speiseöle eintrüben oder die Stenole bei Zusatz von Wasser ausgefällt werden. Für den Einsatz im Nahrungsmittelbereich, in Kosmetika, pharmazeutischen Zubereitungen und im Agrarsektor werden in der europäischen Patentanmeldung **EP-A1 0289636** (Ashai) lagerstabile Emulsionen der Stenolester in Zucker- oder Polyglycerinestern vorgeschlagen. Die Einarbeitung von Sitostanolestern zur Verminderung des Blutcholesteringehaltes in Margarine, Butter, Mayonnaise, Salatsaucen und dergleichen wird in der Europäischen Patentschrift **EP-B1 0594612** (Raision) vorgeschlagen.

Von Nachteil ist jedoch, daß die Phytostenolester den Nahrungsmitteln üblicherweise nur in geringen Mengen zugesetzt werden können, da ansonsten die Gefahr besteht, daß sie den Geschmack und/oder die Konsistenz der Mittel beeinträchtigen. Zur nachhaltigen Beeinflussung des Cholesterin-

gehaltenes im Blut wäre jedoch die Aufnahme größerer Mengen Phytostenolester wünschenswert. Weiterhin verbesserungswürdig ist die Geschwindigkeit, mit der die Stoffe den Gehalt an Cholesterin im Serum vermindern. Die Aufgabe der Erfindung hat folglich darin bestanden, diesen Mängeln abzuhelpfen.

Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Estern von Phytostenolen mit Fettsäuren mit 6 bis 24 Kohlenstoffatomen und mindestens 2 konjugierten Doppelbindungen, gegebenenfalls zusammen mit Potenzierungsmitteln ausgewählt aus der Gruppe, die gebildet wird von Tocopherolen, Chitosanen, Phytostenolsulfaten und/oder (Desoxy)Ribonucleinsäuren, zur Herstellung von hypocholesterinämischen Mitteln.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß Phytostenolester auf Basis konjugierter Fettsäuren bei der Senkung des Cholesteringehaltes im Blut eine deutlich höhere Aktivität zeigen als vergleichbare Phytostenolester, die sich von gesättigten Fettsäuren, einfach ungesättigten Fettsäuren oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit zwei und mehr, nicht-konjugierten Doppelbindungen ableiten. Durch Kombination der erfindungsgemäß zu verwendenden Phytostenolester (Komponente a) mit Potenzierungsmitteln (Komponente b) aus der Gruppe der Chitosane, Phytostenolsulfate und/oder Desoxy- bzw. Ribonucleinsäuren, die selbst über keine oder nur sehr geringe hypocholesterinämischen Eigenschaften verfügen, kann die Abnahme des Cholesteringehaltes im Serum weiter beschleunigt werden. In Gelatine verkapselt lassen sich sowohl die Phytostenolester als auch die Wirkstoffgemische zudem problemlos oral einnehmen.

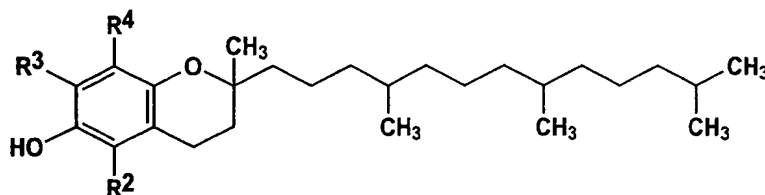
Phytostenolester

Unter Phytostenolen (oder synonym Phytosterolen) sind pflanzliche Steroide zu verstehen, die nur am C-3 eine Hydroxylgruppe, sonst aber keine funktionellen Gruppen tragen. In der Regel besitzen die Phytostenole 27 bis 30 Kohlenstoffatome und eine Doppelbindung in 5/6, gegebenenfalls 7/8, 8/9 oder anderen Positionen. Durch Härtung können aus den ungesättigten Stenolen die entsprechenden gesättigten Stanole erhalten werden, die von der Erfindung mitumfaßt werden. Durch Veresterung der Stenole bzw. Stanole mit ungesättigten Fettsäuren mit konjugierten Doppelbindungen, vorzugsweise konjugierter Linolsäure (CLA) oder konjugierten Fischfettsäuren, werden die Stoffe erhalten, die die Komponente (a) bilden. Die Phytostenolkomponente der Ester kann sich dabei von Ergostenolen, Campestenolen, Stigmastenolen, Brassicastenolen sowie vorzugsweise Sitostenolen bzw. Sitostanolen und insbesondere β -Sitostenolen bzw. β -Sitostanolen ableiten. Die Herstellung kann in an sich bekannter

Weise erfolgen, beispielsweise durch direkte Veresterung der Stenole mit den Fettsäuren und anschließender Härtung der Ester, durch direkte Veresterung der Stanole mit den Fettsäuren oder vorzugsweise durch Umesterung und gegebenenfalls Härtung der Stenole bzw. Stanole mit den entsprechenden Konjuefettsäuremethylestern. Ein allgemeines Herstellverfahren durch Umesterung der Stenole/Stanole mit Fettsäureniedrigalkylestern oder Triglyceriden in Gegenwart geeigneter Katalysatoren, wie z.B. Natriumethylat oder speziell auch Enzymen wird in der **EP-A2 0195311** (Yoshikawa) beschrieben. Im Sinne der Erfindung kann die Fettsäurekomponente der Phytostenolester auch in untergeordneten Mengen (kleiner 50 Mol-%) gesättigte, einfach ungesättigte oder mehrfach ungesättigte, nicht-konjugierte Anteile enthalten. Demzufolge kann beispielsweise zur Herstellung der Ester anstelle reiner konjugierter Linolsäure auch eine technische Mischung mit einem hohen Anteil an konjugierter Linolsäure eingesetzt werden, wie sie beispielsweise unter der Bezeichnung Selin® CLA (Grünau) im Handel erhältlich ist. In gleicher Weise können zur Herstellung der Phytostenolester auch entsprechende Fettsäuremethylester oder Triglyceride (z.B. Selin® CLA-TG) mit hohem Konjuegehalt umgeestert werden.

Tocopherole

Unter Tocopherolen, die als Potenzierungsmittel für die Phytostenolester in Frage kommen, werden in 2-Stellung mit 4,8,12-Trimethyltridecyl-Resten substituierte Chroman-6-ole (3,4-Dihydro-2-*H*-1-benzopyran-6-ole) verstanden, die der Formel (II) folgen,



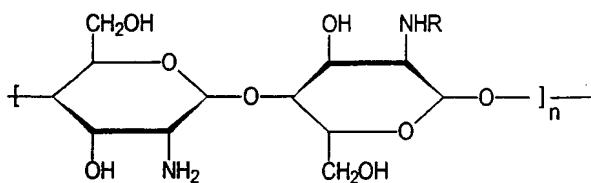
(II)

in der R², R³ und R⁴ unabhängig voneinander für Wasserstoff oder eine Methylgruppe stehen. Tocopherole zählen zu den Biochinonen, also polyprenylierten 1,4-Benzo- bzw. Naphthochinonen, deren Prenylketten mehr oder weniger stark gesättigt sind. Typische Beispiele für Tocopherole, die im Sinne der Erfindung als Komponente (b1) in Betracht kommen, sind Ubichinone, Bovichinone, K-Vitamine und/oder Menachinone (2-Methyl-1,4-Naphthochinone). Man unterscheidet bei den Tocopherolen weiterhin α , β , γ , δ - und ϵ -Tocopherole, wobei letztere noch über die ursprüngliche ungesättigte Prenylseitenkette verfügen, sowie α -Tocopherolchinon und -hydrochinon, bei denen das Pyran-Ringsystem geöffnet ist. Vorzugsweise wird als Komponente (b) α -Tocopherol (Vitamin E) der Formel (II) eingesetzt, bei der R², R³ und R⁴ für Methylgruppen stehen, oder Ester des α -Tocopherols mit Carbon-

säuren mit 2 bis 22 Kohlenstoffatomen, wie beispielsweise α -Tocopherolacetat oder α -Tocopherolpalmitat.

Chitosane

Chitosane, die ebenfalls als Potenzierungsmittel (b2) für die Phytostenolester in Frage kommen, stellen Biopolymere dar und werden zur Gruppe der Hydrokolloide gezählt. Chemisch betrachtet handelt es sich um partiell deacetylierte Chitine unterschiedlichen Molekulargewichtes, die den folgenden - idealisierten - Monomerbaustein (III) enthalten:



(III)

Im Gegensatz zu den meisten Hydrokolloiden, die im Bereich biologischer pH-Werte negativ geladen sind, stellen Chitosane unter diesen Bedingungen kationische Biopolymere dar. Die positiv geladenen Chitosane können mit entgegengesetzt geladenen Oberflächen in Wechselwirkung treten und werden daher in kosmetischen Haar- und Körperpflegemitteln sowie pharmazeutischen Zubereitungen eingesetzt (vgl. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5th Ed., Vol. A6, Weinheim, Verlag Chemie, 1986, S. 231-332). Übersichten zu diesem Thema sind auch beispielsweise von B.Gesslein et al. in HAPPI **27**, 57 (1990), O.Skaugrud in Drug Cosm.Ind. **148**, 24 (1991) und E.Onsoyen et al. in Seifen-Öle-Fette-Wachse **117**, 633 (1991) erschienen. Zur Herstellung der Chitosane geht man von Chitin, vorzugsweise den Schalenresten von Krustentieren aus, die als billige Rohstoffe in großen Mengen zur Verfügung stehen. Das Chitin wird dabei in einem Verfahren das erstmals von Hackmann et al. beschrieben worden ist, üblicherweise zunächst durch Zusatz von Basen deproteiniert, durch Zugabe von Mineralsäuren demineralisiert und schließlich durch Zugabe von starken Basen deacetyliert, wobei die Molekulargewichte über ein breites Spektrum verteilt sein können. Vorzugsweise werden entweder niedermolekulare Chitosane mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von etwa 50.000 bis etwa 250.000 Dalton oder hochmolekulare Chitosane mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von etwa 500.000 bis etwa 2.000.000 eingesetzt. Entsprechende Verfahren sind beispielsweise aus Makromol.Chem. **177**, 3589 (1976) oder der französischen Patentanmeldung FR-A **2701266** bekannt. Besonders bevorzugt werden solche Typen eingesetzt, wie sie in den deutschen Patentanmeldungen DE-A1 **4442987** und DE-A1 **19537001** (Henkel) offenbart werden und die ein durchschnittliches Molekulargewicht von 800.000 bis 1.200.000 Dalton, eine Viskosität nach Brookfield (1 Gew.-%ig in Glycolsäure) unterhalb von 5000 mPas, einen Deacetylierungsgrad im Bereich von 80 bis 88 % und einem Aschegehalt von weniger als 0,3 Gew.-% aufweisen. Neben den Chitosanen als

typischen kationischen Biopolymeren kommen im Sinne der Erfindung auch anionisch bzw. nichtionisch derivatisierte Chitosane, wie z.B. Carboxylierungs-, Succinylierungs- oder Alkoxylierungsprodukte in Frage, wie sie beispielsweise in der deutschen Patentschrift **DE-C2 3713099** (L'Oréal) sowie der deutschen Patentanmeldung **DE-A1 19604180** (Henkel) beschrieben werden.

Phytostenolsulfate

Phytostenolsulfate, die ebenfalls als Potenzierungsmittel (b3) für die Phytostenolester in Frage kommen, stellen bekannte Stoffe dar, die beispielsweise durch Sulfatierung von Phytostenolen mit einem Komplex aus Schwefeltrioxid und Pyridin in Benzol hergestellt werden können [vgl. **J.Am.Chem.Soc. 63, 1259 (1941)**]. Typische Beispiele sind die Sulfate von Ergostenolen, Campestenolen, Stigmastenolen und Sitostenolen. Die Phytostenolsulfate können als Alkali- und/oder Erdalkalimetallsalze, als Ammonium-, Alkylammonium-, Alkanolammonium- und/oder Glucammoniumsalze vorliegen. In der Regel werden sie in Form ihrer Natriumsalze eingesetzt.

(Desoxy)Ribonucleinsäuren

Unter (Desoxy)Ribonucleinsäuren (DNA bzw. RNA), die als letzte Gruppe von Potenzierungsmitteln (b4) für die Phytostenolester in Frage kommen, werden hochmolekulare, fadenförmige Polynucleotide verstanden, die sich von 2'-Desoxy- β -D-ribonucleosiden bzw. D-Ribonucleosiden ableiten, die ihrerseits wieder von äquivalenten Mengen einer Nucleobase und der Pentose 2-Desoxy-D-ribo-furanose bzw. D-Ribofuranose aufgebaut werden. Als Nucleobasen können die DNA bzw. RNA die Purinderivate Adenin und Guanin sowie die Pyrimidine Cytosin und Thymin bzw. Uracil enthalten. In den Nucleinsäuren sind die Nucleobasen N-glykosidisch mit Kohlenstoffatom 1 der Ribose, wodurch im Einzelfall Adenosine, Guanosine, Cytidine und Thimidine entstehen. In den Säuren verknüpft eine Phosphatgruppe die 5'-Hydroxygruppe der Nucleoside mit der 3'-OH-Gruppe der jeweils folgenden durch eine Phospho-diesterbrücke unter Ausbildung von Einzelstrang-DNA bzw. -RNA. Wegen des großen Verhältnisses von Länge zu Durchmesser neigen DNA- bzw. RNA-Moleküle schon bei mechanischer Beanspruchung, etwa bei der Extraktion, zu Strangbruch. Aus diesem Grunde kann das Molekulargewicht der Nucleinsäuren 10^3 bis 10^9 Dalton reichen. Im Sinne der Erfindung werden konzentrierte DNA bzw. RNA-Lösungen eingesetzt, die sich durch ein flüssigkristallines Verhalten auszeichnen. Vorzugsweise werden Desoxy- bzw. Ribonucleinsäuren eingesetzt, die aus marinen Quellen beispielsweise durch Extraktion von Fischsperma erhalten werden und die ein Molekulargewicht im Bereich von 40.000 bis 1.000.000 Dalton aufweisen.

Gewerbliche Anwendbarkeit

Die Wirkstoffmischungen der Erfindung können die Phytostenolester (a) und die Potenzierungsmittel (b) im Gewichtsverhältnis 99 : 1 bis 1 : 99, vorzugsweise 90 : 10 bis 10 : 90, insbesondere 70 : 25 bis 25 : 75 und besonders bevorzugt 60 : 40 bis 40 : 60 enthalten, wobei allein sicherzustellen ist, daß mit der erfindungsgemäßen Verwendung eine zur Senkung des Cholesteringehaltes im Blut ausreichende Menge der Komponente (a) aufgenommen wird. In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung werden die Phytostenolester – alleine oder zusammen mit den Potenzierungsmitteln - in an sich bekannter Weise in Gelatine verkapselt, wobei man die Komponenten (a) und gegebenenfalls (b) jeweils in Mengen von 0,1 bis 50, vorzugsweise 1 bis 30, insbesondere 5 bis 25 und besonders bevorzugt 10 bis 15 Gew.-% - bezogen auf das Gewicht der Gelatine kapseln - einsetzt. Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Erkenntnis, daß die Verkapselung der Phytostenolester in Gelatine eine vorteilhafte Ausführungsform für die orale Aufnahme der Wirkstoffe darstellt.

Eine weitere Verabreichungsform der Phytostenolester sind Zäpfchen, die rektal oder vaginal eingeführt werden können, und als Suppositoriengrundmasse ebenfalls Gelatine, gegebenenfalls in Kombination mit Glycerin, oder aber synthetische Fette bzw. Wachse, Polyethylenglycole oder natürliche Bestandteile wie z.B. Kakaobutter enthalten können. Daneben ist es möglich, die Phytostenolester in üblichen Nahrungsmitteln zu lösen bzw. zu dispergieren, als da beispielsweise sind : Salatöle, Dressings, Mayonnaisen, Margarinen, Butter, Fritierfette, Kakaoprodukte, Wurst und dergleichen.

Beispiele

Beispiele 1 bis 5, Vergleichsbeispiele V1 bis V3

Es wurden Gelatinekapseln (Gewicht ca. 1,5 g) mit einem Gehalt von 5 Gew.-% verschiedener β -Sitenolester und gegebenenfalls Vitamin E sowie 0,5 Gew.-% radioaktiv markiertem Cholesterin hergestellt. Zur Untersuchung der hypocholesterinämischen Wirkung ließ man männliche Ratten (Einzelgewicht ca. 200 g) über Nacht fasten. Am folgenden Tag wurde den Versuchstieren jeweils eine zerkleinerte Gelatinekapsel mit etwas kochsalzhaltigem Wasser über eine Magensonde eingeführt. Nach 3, 6, 12, 24 und 48 h wurde den Tieren Blut abgenommen und der Gehalt an radioaktivem Cholesterin bestimmt. Die Ergebnisse, die den Mittelwert der Messungen von 10 Versuchstieren darstellen, sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Angaben zur Abnahme der Radioaktivität verstehen sich jeweils in Bezug auf eine Blindgruppe von Versuchstieren, denen lediglich Gelatinekapseln mit einem Gehalt von 20 Gew.-% Vitamin E und einer entsprechenden Menge radioaktiv markiertem Cholesterin verabreicht worden war. Die Mischungen 1 bis 5 sind erfindungsgemäß, die Mischungen V1 bis V3 dienen dem Vergleich.

Tabelle 1

Hypocholesterinämische Wirkung (Mengenangaben als Gew.-% bezogen auf Gelatinekapsel)

Zusammensetzung/Aktivität	1	2	3	4	5	V1	V2	V3
Konjuefettsäure- β -sitostenolester*	5	-	-	-	-	-	-	-
konj. C ₁₂ -C ₂₄ -Fischfettsäure- β -sitostenolester	-	5	-	-	-	-	-	-
Konjuefettsäure- β -sitostanolester*	-	-	5	-	-	-	-	-
konj. C ₁₂ -C ₂₄ -Fischfettsäure- β -sitostenolester	-	-	-	5	5	-	-	-
Laurinsäure- β -sitostanolester	-	-	-	-	-	-	-	-
Ölsäure- β -sitostanolester	-	-	-	-	-	5	-	-
Linolsäure- β -sitostanolester	-	-	-	-	-	-	5	-
Vitamin E	-	-	-	-	5	-	-	5
Radioaktivität [%-rel]								
- nach 3 h	95	95	95	95	95	95	95	95
- nach 6 h	80	79	78	78	75	84	82	83
- nach 12 h	72	70	68	67	61	76	74	73
- nach 24 h	45	45	43	43	39	51	48	47
- nach 48 h	21	20	18	17	15	30	26	25

*) Fettsäurebasis: Selin® CLA (Grünau/Illertissen)

Patentansprüche

1. Verwendung von Estern von Phytostenolen mit Fettsäuren mit 6 bis 24 Kohlenstoffatomen und mindestens 2 konjugierten Doppelbindungen zur Herstellung von hypocholesterinämischen Mitteln
2. Verwendung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Ester von β -Sitostenol oder β -Sitostanol einsetzt.
3. Verwendung nach den Ansprüchen 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Ester von β -Sitostenol bzw. β -Sitostanol mit konjugierter Linolsäure einsetzt.
4. Verwendung nach den Ansprüchen 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Ester von β -Sitostenol bzw. β -Sitostanol mit konjugierter Fischfettsäure einsetzt.
5. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Phytostenolester zusammen mit Potenzierungsmitteln einsetzt, die ausgewählt sind aus der Gruppe, die gebildet wird von Tocopherolen, Chitosanen, Phytostenolestern und (Desoxy)-Ribonucleinsäuren sowie deren Gemischen.
6. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Potenzierungsmittel Vitamin E einsetzt.
7. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Potenzierungsmittel Chitosane mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht im Bereich von 50.000 bis 250.000 bzw. 500.000 bis 2.000.000 Dalton einsetzt.
8. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Potenzierungsmittel marine Desoxyribonucleinsäuren einsetzt, die ein Molekulargewicht im Bereich von 40.000 bis 1.000.000 Dalton aufweisen.
9. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Komponenten (a) und gegebenenfalls (b) in Gelatine verkapselt.
10. Verwendung nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Phytostenolester in Mengen von 0,1 bis 50 Gew.-% - bezogen auf das Gewicht der Gelatinekapseln - einsetzt.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/07057

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K31/575 A61K31/70 A61K31/715

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K A23L A23D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 98 23277 A (HENKEL KGAA) 4 June 1998 see page 2, paragraph 5 - page 3, paragraph 1; claims 1-10 see page 5, paragraph 3-4 ---	1,2,5-10
A	DE 24 08 067 A (PROCTER & GAMBLE) 5 September 1974 see page 1 - page 2, paragraph 1 see page 3, paragraph 2; claims 1-4 see page 5, paragraph 4 see page 7, paragraph 2 - page 8 ---	1-4,6,9, 10
A	US 5 244 887 A (STRAUB CARL D) 14 September 1993 see column 6, line 10-12; claims 1-5 see column 6, line 23-41 --- -/--	1,6

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 April 1999

Date of mailing of the international search report

04/05/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kanbier, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. Application No.

PCT/EP 98/07057

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 096, no. 004, 30 April 1996 & JP 07 330611 A (YAKULT HONSHA CO LTD), 19 December 1995 see abstract ----	1,2
A	WO 92 19640 A (RAISION MARGARIINI OY) 12 November 1992 see page 5, paragraph 2; examples 1-4 see page 6, line 30-34 see page 9, paragraph 3; claims 1,2,4,6,7 ----	1,2
A	FR 2 228 493 A (FERRER LABOR) 6 December 1974 see page 1, line 21-25; claims 1,2 -----	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Pat. Application No

PCT/EP 98/07057

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9823277 A	04-06-1998	DE 19700796 A AU 5322998 A AU 5553198 A WO 9823275 A	04-06-1998 22-06-1998 22-06-1998 04-06-1998
DE 2408067 A	05-09-1974	US 3865939 A BE 811452 A CA 1024814 A FR 2218838 A GB 1413102 A JP 1135221 C JP 50040605 A JP 57026732 B NL 7402426 A,C	11-02-1975 22-08-1974 24-01-1978 20-09-1974 05-11-1975 14-02-1983 14-04-1975 07-06-1982 27-08-1974
US 5244887 A	14-09-1993	NONE	
WO 9219640 A	12-11-1992	CA 2102112 A AU 664827 B DE 69127207 D DE 69127207 T DK 594612 T EP 0594612 A FI 934869 A,B, FI 964951 A HK 1001951 A JP 6506909 T NO 933966 A PL 166991 B RU 2095367 C US 5502045 A	04-11-1992 07-12-1992 11-09-1997 22-01-1998 01-09-1997 04-05-1994 03-11-1993 11-12-1996 24-07-1998 04-08-1994 02-11-1993 31-07-1995 10-11-1997 26-03-1996
FR 2228493 A	06-12-1974	AT 336203 B AU 6874774 A BE 814741 A CH 589673 A DE 2422317 A GB 1473574 A JP 50129543 A JP 53035071 B NL 7406089 A,B ZA 7402921 A	25-04-1977 13-11-1975 02-09-1974 15-07-1977 21-11-1974 18-05-1977 13-10-1975 25-09-1978 12-11-1974 28-05-1975

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/07057

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K31/575 A61K31/70 A61K31/715

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K A23L A23D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 98 23277 A (HENKEL KGAA) 4. Juni 1998 siehe Seite 2, Absatz 5 - Seite 3, Absatz 1; Ansprüche 1-10 siehe Seite 5, Absatz 3-4	1,2,5-10
A	DE 24 08 067 A (PROCTER & GAMBLE) 5. September 1974 siehe Seite 1 - Seite 2, Absatz 1 siehe Seite 3, Absatz 2; Ansprüche 1-4 siehe Seite 5, Absatz 4 siehe Seite 7, Absatz 2 - Seite 8	1-4,6,9,10
A	US 5 244 887 A (STRAUB CARL D) 14. September 1993 siehe Spalte 6, Zeile 10-12; Ansprüche 1-5 siehe Spalte 6, Zeile 23-41	1,6
	--- -/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. April 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

04/05/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Kanbier, D

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. Jnales Aktenzeichen

PCT/EP 98/07057

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 096, no. 004, 30. April 1996 & JP 07 330611 A (YAKULT HONSHA CO LTD), 19. Dezember 1995 siehe Zusammenfassung ---	1,2
A	WO 92 19640 A (RAISION MARGARIINI OY) 12. November 1992 siehe Seite 5, Absatz 2; Beispiele 1-4 siehe Seite 6, Zeile 30-34 siehe Seite 9, Absatz 3; Ansprüche 1,2,4,6,7 ---	1,2
A	FR 2 228 493 A (FERRER LABOR) 6. Dezember 1974 siehe Seite 1, Zeile 21-25; Ansprüche 1,2 -----	1,2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. nales Aktenzeichen

PCT/EP 98/07057

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9823277 A	04-06-1998	DE 19700796 A AU 5322998 A AU 5553198 A WO 9823275 A	04-06-1998 22-06-1998 22-06-1998 04-06-1998
DE 2408067 A	05-09-1974	US 3865939 A BE 811452 A CA 1024814 A FR 2218838 A GB 1413102 A JP 1135221 C JP 50040605 A JP 57026732 B NL 7402426 A,C	11-02-1975 22-08-1974 24-01-1978 20-09-1974 05-11-1975 14-02-1983 14-04-1975 07-06-1982 27-08-1974
US 5244887 A	14-09-1993	KEINE	
WO 9219640 A	12-11-1992	CA 2102112 A AU 664827 B DE 69127207 D DE 69127207 T DK 594612 T EP 0594612 A FI 934869 A,B, FI 964951 A HK 1001951 A JP 6506909 T NO 933966 A PL 166991 B RU 2095367 C US 5502045 A	04-11-1992 07-12-1992 11-09-1997 22-01-1998 01-09-1997 04-05-1994 03-11-1993 11-12-1996 24-07-1998 04-08-1994 02-11-1993 31-07-1995 10-11-1997 26-03-1996
FR 2228493 A	06-12-1974	AT 336203 B AU 6874774 A BE 814741 A CH 589673 A DE 2422317 A GB 1473574 A JP 50129543 A JP 53035071 B NL 7406089 A,B ZA 7402921 A	25-04-1977 13-11-1975 02-09-1974 15-07-1977 21-11-1974 18-05-1977 13-10-1975 25-09-1978 12-11-1974 28-05-1975



41
.
31

3
.
5